

0722641-1

На правах рукописи

Мбайнаджи Лодум



**ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕАЗ  
ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА  
ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ**

03.00.04 - биохимия

**Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Казань - 2001**

Работа выполнена на кафедре биохимии Казанского государственного университета.

Научные руководители : доктор биологических наук,  
Абрамова З.И.  
кандидат медицинских наук,  
Бойчук С.В.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,  
профессор, Коксин В.П.  
кандидат биологических наук,  
Саттарова Л.И.

Ведущая организация: Казанская медицинская академия

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА  
КФУ



Защита состоится 21 июня 2001 в 14<sup>30</sup> часов на заседании  
Диссертационного Совета Д 212.081.08 при Казанском  
государственном университете (420008, г. Казань, ул. Кремлевская,  
д.18, главное здание, ауд. 209).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке  
имени Н.И. Лобачевского при Казанском государственном  
университете.

Реферат разослан "19" мая 2001 г.

Ученый секретарь Диссертационного Совета,  
кандидат биологических наук *Аскарова* Аскарова А.Н.

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность проблемы.** Хронические обструктивные болезни легких включают гетерогенную по своей природе группу легочных заболеваний - бронхиальная астма, эмфизема, хронический обструктивный бронхит, которые объединяет расстройство функций внешнего дыхания легких по обструктивному типу. Эти заболевания входят в число лидирующих причин по числу нетрудоспособности, инвалидности и занимают четвертое-пятое место среди других причин смерти. Исследования, проведенные в различных странах, показывают, что в США около 14 млн. людей страдает хроническим обструкционным бронхитом легких (ХОБЛ), причем 12,5 млн. - хроническим бронхитом, а 1,65 млн. - эмфиземой. По сравнению с 1982 г. отмечается рост заболеваемости на 41 %. В 60-е годы, по данным британских исследователей 17 % взрослых Объединенного Королевства страдали ХОБЛ. Было отмечено, что 25 % взрослых в молодости страдали бронхитом (Report, 1961). В России данные медицинской статистики свидетельствуют, что болезни органов дыхания занимают по распространению 1 место: 15073,2 на 100000 населения, далее следуют сердечно-сосудистые заболевания - 14385,4, нервной системы - 13491,0.

Эпидемиологические исследования показывают определенную связь развития ХОБЛ с социально-экономическим состоянием человека, его образованием, интеллектом, что в конечном счете позволяет осознать известные факторы риска окружающей среды и иметь материальную и моральную готовность избежать их патогенного влияния.

Вследствие суммирования факторов риска окружающей среды и генетической предрасположенности развивается хронический воспалительный процесс, в который вовлекаются все морфологические структуры легких (Nerd, 1994). Первичные механизмы патогенеза ХОБЛ находятся на молекулярно-клеточном уровне. Именно этот уровень определяет индивидуализацию клинических проявлений ХОБЛ у больных. Практически все клеточные элементы респираторной системы под влиянием этиологических факторов активизируются и участвуют в воспалительной реакции (Walsh, 1993).

Несмотря на то, что патогенез гиперреактивности бронхов, возникающий на первой стадии воспаления, до настоящего времени полностью не ясен, предполагается, что он возникает в результате взаимодействия Т-лимфоцитов, нейтрофилов, тучных клеток, макрофагов и тромбоцитов (Томсон В.В., 1998). Показано, что на первой фазе развития бронхита, когда взаимоотношения между клетками бронхиального эпителия относительно сохранены и имеется лишь признаки гиперсекреции, именно лимфоциты являются преобладающими клетками инфильтрата (Кононов и др., 1987). Убедительно показано, что лимфоциты и другие клетки, мигрировавшие в легочную ткань, имеют строго определенный фон жизни, по истечению которого они подвергаются

элиминации посредством запуска процесса их программированной клеточной гибели или апоптозу (Ярилин и др., 2000; Tomei, 1994; Zhoul, et al., 1993).

Исследования процессов апоптоза лимфоцитов у больных бронхиальной астмой (БА) свидетельствуют об устойчивости данных клеток к апоптозу, что проявляется в замедлении процессов фрагментации ДНК этих клеток при инкубации в среде *in vitro* (Melis et al., 1997; Thomas, 1992).

Интерес к роли эндогенных дезоксирибонуклеаз в расщеплении ДНК при апоптозе стали проявлять лет 20 назад. Впервые было установлено, что ДНК гидролизуются эндонуклеазами до отдельных нуклеосом (Hewish, Burgoyne, 1973). Позднее (Wyllie, 1983) установлена связь между расщеплением ДНК на субъединицы по 180 пар оснований (ПО) и эндонуклеазной активностью. Установлено, что разные типы клеток могут иметь свои особенности в активации эндонуклеаз при апоптозе в нормально дифференцирующихся клетках (Epari et al., 1998; Pandey et al., 1997; Walke et al., 1994), и значительно меньше знаний о механизме апоптоза при патологиях в развитии ткани, и в частности, при острых воспалениях (McConkey et al., 1997). В связи с этим в данной работе было сосредоточено внимание на изучении нуклеаз лимфоцитов.

Разработка методов определения повреждений ДНК в лимфоцитах, позволит начинать лечение заболевания легких еще до появления клинических признаков.

**Цель и задачи исследования.** Целью настоящей работы было обнаружение и изучение ядерных и цитоплазматических нуклеаз лимфоцитов при хронической бронхиальной астме.

В задачи исследования входило:

1. Выделение лимфоцитов из клеток периферической крови больных бронхиальной астмой и здоровых доноров.
2. Получение белковых фракций цитоплазмы и хроматина лимфоцитов.
3. Исследование ДНКазной активности белков цитоплазмы и хроматина лимфоцитов
4. Сравнительное изучение активности ДНКазы лимфоцитов больных бронхиальной астмой и здоровых доноров.

**Научная новизна.** Впервые исследована нуклеазная активность клеток специфического иммунного ответа, которые привлекаются в очаг воспаления при хронических obstructивных болезнях легких - лимфоцитов. Показано, что в лимфоцитах больных при спонтанном апоптозе происходит увеличение нуклеазной активности, активируемой ионами  $Mg^{2+}$ . Установлена корреляция между активностью ДНКазы и стадией развития болезни. При ремиссии БА. у больных ДНКазная активность снижается до уровня активности лимфоцитов здоровых доноров.

**Практическая значимость.** Разработаны методы определения нуклеазной активности белков цитоплазмы и хроматина лимфоцитов здоровых людей и при ХОБЛ, что позволяет использовать их как при ранней диагностике

заболевания легких, так и для прогнозирования эффективности проводимого лечения.

**Апробация работы.** Основные результаты исследования докладывались на VII Всероссийской школе молодых ученых “Актуальные проблемы нейробиологии” (г. Казань, 2000); I-ой научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета (г.Казань, 2000); на XII Всероссийской юбилейной конференции “Ферменты микроорганизмов”(г.Казань, 2001); а также на итоговой научной конференции КазГУ (г.Казань, 2001).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 5 работ.

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов, изложения собственных результатов, обсуждения выводов, приложения и литературы.

Работа изложена на 132 страницах компьютерной верстки, содержит 14 таблиц, 22 рисунка. Список использованной литературы включает 172 наименования, из них 36 отечественных.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИИ**

Объектом исследования явились лимфоциты периферической крови 20 больных хронической бронхиальной астмой (БА) и 20 здоровых доноров. Диагноз атопической формы аллергического заболевания подтверждался аллергологическим анамнезом, положительными результатами кожных скарификационных и, в ряде случаев, внутрикожных проб с аллергенами

Оценка апоптоза лимфоцитов осуществлялась методом проточной цитофлюорометрии на приборе Facscon (Becton Dickinson). Уровень апоптоза, оцениваемого по количеству гиподиплоидных лимфоцитов (окраска флуорохромом пропидия йодида) у здоровых доноров и больных БА, проводили по методу Nicoletti, Migliorati, (1991).

Лимфоциты выделяли при равновесном центрифугировании на преформированном градиенте перколлы ( $\rho$ 1.105, 1.095, 1.090, 1.085, 1.077, 1.070), предварительно осадив эритроциты 7 %-ным раствором декстрана Т-500. Клетки, выделенные с интерфаз 1.077-1.090, промывали в ФСБ и лизинг-раствором.

Изучение наличия разрывов в ДНК лимфоцитов здоровых доноров и больных бронхиальной астмой изучали по изменению скорости седиментации ядерной ДНК методом зонально-скоростного центрифугирования в нейтральном pH 8,0 и щелочном градиенте плотности сахарозы (pH 12,0). Процесс выделения ДНК включал суспензирование клеток в ФСБ, наслаивание на поверхность лизирующего раствора, содержащего 1,95М NaCl, флотирования на поверхности линейного градиента 5 - 20 %-ного раствора сахарозы, содержащего 1,95 М NaCl /, 0,01М трис буфера pH 8,0, а в случае

щелочного градиента - pH 12,0. Центрифугирование вели на ультрацентрифуге VAC-602. Положение фрагментов ДНК в градиенте плотности сахарозы оценивали при длине волны  $E_{260}$ , пропуская градиент через увикорд ("Singl Path Monitor UV-I Farmacia") с постоянной скоростью, регистрируя на самописце ("ONF-Channel Recorder Rec-1"). О седиментационной подвижности судили по расстоянию, пройденному ДНК лимфоцитов в градиенте сахарозы по сравнению с маркером (ДНК с известным  $Sw$ ), для этого на диаграммной ленте самописца при постоянной скорости ее движения измеряли расстояние ( в см ), пройденное ДНК от мениска до середины пика.

Получение белковых фракций хроматина. Для получения белковых фракций хроматина и цитоплазмы лимфоцитов использовали метод фракционирования белков хроматина, основанный на последовательной диссоциации цитоплазматических и ядерных белков в растворах NaCl возрастающей ионной силы (Георгиев и др., 1969). В результате при ступенчатом увеличении ионной силы раствора диссоциируются только определенные фракции белков. Для диссоциации использовали 0,01, 0,15, 0,4 М раствора NaCl в 0,01 М трис буфере, pH 7,2 (Беляева и др., 1970 ).

Получение плазмидной ДНК pBR 322. Для амплификации ДНК pBR 322 использовали бактериальную культуру *Escherichia coli* / *Hb 101* - pBR 322. Сбор бактерий, их лизис, и выделение проводили по методу (Маниатис, 1984). ДНК pBR 322 очищали от РНК гель-хроматографией на колонке Sepharose CL-4B.

Ферментативную активность исследуемых белковых фракций определяли по приросту продуктов гидролиза ДНК (Беляева и др., 1970). Активность выражали в спектрофотометрических единицах увеличения кислоторастворимых продуктов при гидролизе нативной ДНК или денатурированной ДНК при длине волны 260 нм за 60 мин инкубации при 37° С на 1мг белка (удельная активность) или на 1 мл ферментного раствора (общая активность).

Специфичность отношения ДНКаз ко вторичной структуре ДНК изучали электрофорезом в 0,7 % агарозном геле, используя суперспиральную ДНК pBR 322 и регистрируя переход формы I через форму II (открытое ковалентно замкнутое кольцо ) до формы III ( линейная ДНК ). Инкубационная проба содержала 100 мкл ДНК pBR 322 (20-50 мкг/мл) /60 мкл 0,2 М трис-буфера (pH 7,2-7,3) / 20 мкл 0,025  $MnCl_2$  или  $MgCl_2$  (50 мкМ) и  $CaCl_2$  (1 мкМ). Концентрация белка-фермента в исследуемых фракциях здоровых доноров и больных уравнивалась и составляла 0,45-1,0 мкг/мл. Реакцию останавливали добавлением 10 %-ного раствора ДДС-Na / 0,1%-ного бромфенолового синего / 50%-ного глицерина. Контролем перехода форм ДНК служила проба ДНК, содержащая смесь форм I, II и III. Электрофорез проводили в горизонтальном направлении на пластинах размером 10×10×3 мм при силе тока 4 мА/см в течение 1,0-1,5 ч при 20° С. Определение полос проводили раствором этидиум бромид ( 2 мкг/мл ) в течение 40 мин.

Количественную оценку изменения активности ДНКаз (скорости гидролиза ДНК) больных бронхиальной астмой в зависимости от стадии развития болезни и здоровых доноров проводили флуорометрическим методом (Винтер, 1969), определяя  $T_{1/2}$  - время, за которое 50 % молекул ДНК (форма I) приобретают одонитевые разрывы. Для оценки результатов электрофоретического изучения продуктов реакции, полученных *in vitro*, использовали программу Imag Master, разработанную фирмой Pharmacia Biotech, сканирование электрофореграмм проводили на сканере Sharp JX-330. В результате сканирования электрофореграмм формируется графическое (в виде пиков) изображение форм перехода ДНК и оценивается их площадь в процентах.

Для оценки достоверности полученных данных использовали двухвыборочный t-тест для различных дисперсий.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОДНОНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ В ДНК КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

Изучение структуры ДНК клеток периферической крови у здоровых доноров и больных бронхиальной астмой и для сравнения клеток крови больных острым лейкозом было проведено по изменению скорости седиментации ядерной ДНК лейкоцитов при ультрацентрифугировании в нейтральном и щелочном градиенте плотности сахарозы с использованием этидиум бромид. Известно, что бромистый этидий, интеркалируя между соседними парами оснований ДНК, способен расплетать кольцевую молекулу ДНК и менять (снижать) ее скорость седиментации. Возникновение одонитевых разрывов приводит к релаксации молекулы, соответственно, такая молекула способна больше интеркалировать этидиум бромид, в связи, с чем скорость седиментации ДНК продолжает снижаться, по сравнению с неповрежденной молекулой.

Результаты наших исследований показали (рис.1, 2), что в нейтральном градиенте плотности сахарозы ДНК клеток больных бронхиальной астмой и острым лейкозом имеют меньшую скорость седиментации, чем ДНК здорового донора. Причем ДНК клеток больных острым лейкозом седиментирует медленнее, чем ДНК клеток больного бронхиальной астмой, что свидетельствует о меньшем нарушении структуры ДНК больных бронхиальной астмой. Центрифугирование в щелочном градиенте сахарозы показало, что ДНК больных бронхиальной астмой и острым лейкозом распределена по градиенту в виде нескольких пиков.

ДНК больных бронхиальной астмой и острым лейкозом распределена по градиенту в виде нескольких пиков.

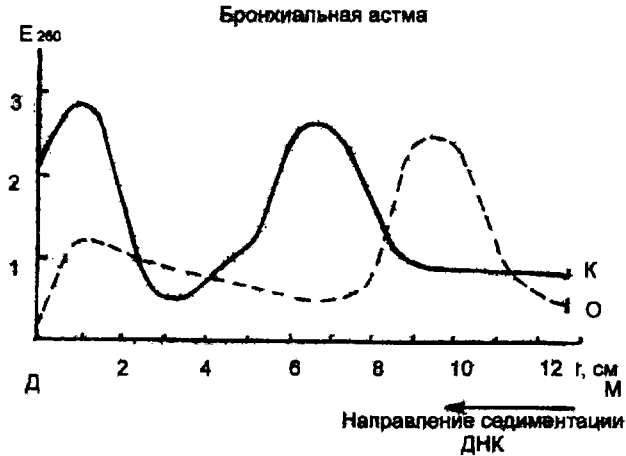


Рис.1 Седиментограмма ДНК больного бронхиальной астмой (опыт). Контроль (К) - ДНК здорового донора. (Нейтральный градиент сахарозы 10-30% ; г, см - расстояние на ленте самописца при раскалывании градиента от мениска (М) до дна (Д) пробирки).

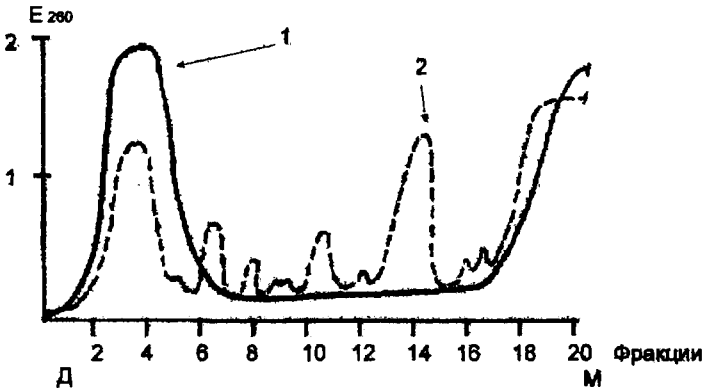


Рис.2. Седиментограмма ДНК больного острым лейкозом (кривая-2). Кривая 1 - ДНК здорового донора. Щелочной градиент сахарозы. Д-дно, М-мениск пробирки; стрелка - направление седиментации.



Это указывает на присутствие в препаратах фрагментов ДНК с различным значением  $S$ , который ниже, чем в контрольных препаратах (сидиментирующая ДНК здорового донора).

Таким образом, изучение скорости седиментации ДНК клеток здоровых доноров и больных бронхиальной астмой показало, что ДНК лейкоцитов здоровых доноров почти не содержит односторонних разрывов, а структура ДНК из клеток больных нарушена.

Для выяснения возможных причин образования разрывов в структуре ДНК периферической крови *in vivo*, мы получили очищенную фракцию лимфоцитов.

## 2. ВЫДЕЛЕНИЕ ЛИМФОЦИТОВ

Лимфоциты из периферической крови больных и доноров выделяли при равновесном центрифугировании на преформированном градиенте плотности перколлы по представленной схеме (рис.3).

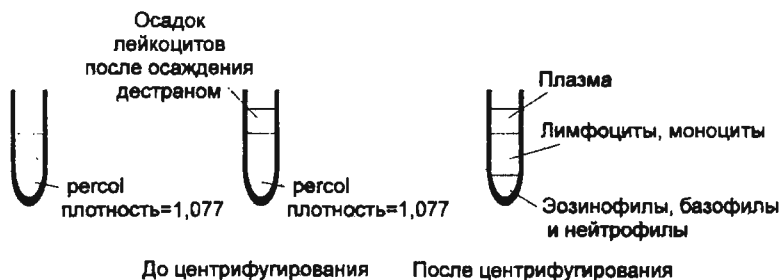


Рис 3. Схема выделения лимфоцитов.

В результате очистки степень чистоты полученных фракций лимфоцитов составила 85-94 %.

Для апоптозирующих клеток характерна межнуклеосомная фрагментация ядерной ДНК, приводящая *in vivo* к образованию апоптотических телец. Для их идентификации мы применили метод, разработанный (Nicoletti, Migliorati, 1991), по которому определяли наличие гиподиплоидной зоны (на седиментограмме), где локализуются клетки, подвергшиеся апоптозу. Результаты проведенных исследований показали, что инкубация лимфоцитов больных бронхиальной астмой и доноров *in vitro* приводит с течением времени к их гибели. Часть клеток погибает по типу апоптоза. При этом отмечено, что количество клеток с гиподиплоидной ДНК через 72 ч инкубации среди лимфоцитов доноров выше, чем среди лимфоцитов больных бронхиальной астмой. При индуцированном апоптозе лимфоцитов больных количество клеток с гиподиплоидной зоной увеличивалось незначительно, что

Полученную фракцию лимфоцитов использовали для изучения нуклеазной активности белков цитоплазмы и хроматина этих клеток.

### 3. ИЗУЧЕНИЕ ДНКазной активности лимфоцитов

Определенные сложности при фракционировании белков лимфоцитов человека связаны с малым количеством получаемых клеток, и проблемой сохранения целостности ядер при получении цитоплазматических белков. Мы применили метод фракционирования белков хроматина, основанный на последовательной диссоциации цитоплазматических и ядерных белков в растворах NaCl возрастающей ионной силы и использовали для этого 0,01, 0,15, 0,4 и 0,6 М растворы NaCl в 0,01 М трис-буфере, pH 7,2.

Находящиеся в физиологической среде лимфоциты, после концентрирования центрифугированием, промывали в 0,32 М растворе сахарозы на 0,01 М трис-HCl буфере (pH 7,2), содержащем 0,003 М  $\text{CaCl}_2$ . Это сохраняло структуру лимфоцитов, затем осадок клеток промывали в трис-буфере с кальцием, растирали в гомогенизаторе Поттера, заливали 5-кратным объемом этого же буфера, содержащего 0,01 М NaCl. После экстракции и центрифугирования получали фракцию цитоплазматических белков (фракция 0,01). Оставшийся осадок заливали одним объемом буфера без  $\text{Ca}^{2+}$ , в результате ядра лизировались. Полученный нуклеопротеид последовательно экстрагировали буферами с различной ионной силой. Таким образом, было получено четыре белковые фракции лимфоцитов: фракция 0,01 (белки цитоплазмы), фракция 0,15, фракция 0,4 и фракция 0,06. Концентрация белка в исследуемых фракциях клеток больных и здоровых доноров уравнивалась и составляла 0,45-1,0 мкг/мл.

При определении активности в них, выяснилось, что при добавлении к гомогенату лимфоцитов больных активаторов - ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ , ДНКазная активность не обнаруживается. При добавлении ионов  $\text{Mn}^{2+}$  белки гомогената слабо гидролизуют высокополимерную нативную ДНК, но достаточно активно гидролизуют денатурированную ДНК. Удельная активность  $\text{Mn}^{2+}$ -зависимой ДНКазы гомогената составила, примерно, 4,0 ед на мг белка. В отдельных белковых фракциях также была обнаружена ДНКазная активность, в частности, во фракции 0,4 она составила около 50 ед. на мг белка. Во фракции 0,6 ДНКазной активности не обнаружили.

Для изучения отношения обнаруженной ДНКазной активности к вторичной структуре ДНК, мы использовали плазмидную ДНК pBR 322 (на 88 - 90 % представленную суперспиральной ДНК (форма I) (рис. 4)) и активаторы - ионы  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$ .

Результаты показали, что в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  все фракции белков лимфоцитов обладают ДНКазной активностью.

Результаты показали, что в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  все фракции белков лимфоцитов обладают ДНКазной активностью.

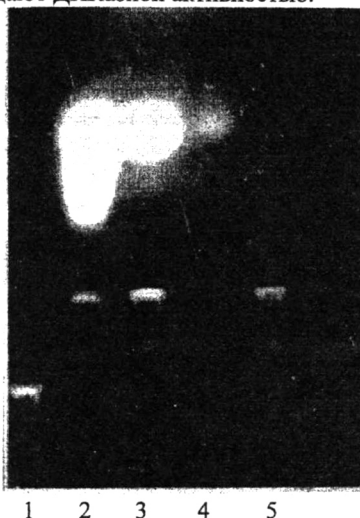


Рис.4. Электрофореграммы на различных этапах очистки ДНК рВР 322; 1 -  $\lambda$  ДНК, 2 - фракция ДНК после обработки фенолом, 3 - фракция ДНК после обработки ацетатом аммония, 4 - фракция РНК после очистки на сефарозе 4В, 5- ДНК рВР 322 после хроматографии на сефарозе 4В (электрофорез в 0,7%-ном ага розном геле).

Однако, продукты реакции с ДНКазми лимфоцитов больных регистрировались только через 10 - 15 мин после начала реакции. Отмечено, что если при добавлении к суперспиральной ДНК (форма I) белков цитоплазмы (фракции 0,01) через 15 мин образуются кроме кольцевой открытой ДНК (форма II) молекулы линейной ДНК (форма III), то при взаимодействии белков лабильно связанных с хроматином (фракции 0,15) с суперспиральной ДНК, линейная ДНК появляется только через 60-90 мин после начала реакции. Во фракции 0,4 ДНКазой активности, переводящей ДНК формы II в ДНК формы III обнаружено не было.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -зависимая ДНКаз белков лабильно связанных с хроматином лимфоцитов здоровых доноров более активно гидролизовала субстрат до линейной ДНК.

При инкубации ДНК с белковыми фракциями в присутствии ионов  $\text{Mn}^{2+}$  продукты реакции выявлялись уже через 0,5 - 2 мин. Отмечено, что ДНКазы фракции 0,01 и 0,15 гидролизуют ДНК формы I до линейных молекул (форма III), а фермент фракции 0,4 гидролизует ДНК рВР 322 только до "открытого" кольца (форма II). Это позволило сделать предположение, что ДНКаз фракции 0,4 лимфоцитов имеет предпочтение к денатурированной ДНК и является

мин не приводило к полному переходу кольцевой ДНК в линейную. Такую устойчивость релаксированной кольцевой ДНК к действию ДНКазы фракции 0,4 лимфоцитов нельзя было объяснить и недостаточной дозой белка (0,45 мкг/мл), так как добавление десятикратного количества белка-фермента не приводило к значительному увеличению линейной ДНК (ДНК формы III). Поэтому, устойчивость ДНК формы II к обнаруженному ферменту фракции 0,4, мы объясняем тем, что ДНКазы специфична к однонитевым участкам ДНК, и при переходе ДНК из формы I в форму II, в результате единичного разрыва, когда происходит мгновенное восстановление водородных связей в денатурированных участках, такая ДНК приобретает устойчивость к этому ферменту.

Таким образом, ДНКазы фракции 0,4 лимфоцитов напоминает  $Mn^{2+}$ -зависимую эндонуклеазу печени крыс, описанную ранее в Казанском университете (Беляева и соавт., 1970; Винтер и соавт., 1993).

Количественная оценка продуктов реакции (табл.1-3) показала, что ДНКазы цитоплазмы (фракция 0,01) и белков хроматина (фракция 0,4) из лимфоцитов больных бронхиальной астмой и здоровых доноров незначительно различаются по активности. Более выраженные различия выявлены во фракциях белков-ферментов здоровых доноров и больных, экстрагируемых при ионной силе 0,15 M NaCl (белки фракций 0,15). Из табл. 2 следует, что ДНКазы лимфоцитов больных почти в 2 раза активнее гидролизует ДНК формы I до формы III. Но если ДНКазы больных активнее переводит ДНК формы II в форму III (т.е. идет активная фрагментация ДНК), то ДНКазы здоровых доноров активнее переводит ДНК формы I в форму II и далее гидролиз этой формы значительно замедляется.

Таким образом, можно предположить, что ДНКазы, ответственные за фрагментацию ДНК в апоптотических клетках при бронхиальной астме, локализуются во фракции лабильно связанных с хроматином белков.

При изучении динамики изменения активности  $Mn^{2+}$ -зависимой ДНКазы фракции 0,4 больных бронхиальной астмой на стадии ремиссии по сравнению с ДНКазной активностью здоровых (доноров по определению времени образования единичных разрывов в 50 % молекул  $T_{1/2}$ ), показано, что в среднем  $T_{1/2}$  больных равно 53,56 сек  $\pm$  36,29, а доноров равно 69,17 сек  $\pm$  34,93. Следовательно, ДНКазная активность лимфоцитов больных бронхиальной астмой несколько выше, чем в клетках здоровых доноров.

Для изучения изменения активности этой ДНКазы, было отобрано 2 группы больных бронхиальной астмой по 9 человек. В состав этих групп входило: 3 человека с легкой степенью заболевания, 3 человека со средней степенью тяжести заболевания и 3 человека с более тяжелым течением болезни.

Таблица 1

**Количественная оценка продуктов реакции  
ДНК рBR 322 с белками фракции 0,01**

Донор								Больной						
Дор-ки		К	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Время, мин			0	2,5	5	10	20	60	0	2,5	5	10	20	60
Форма		%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
Д	I	78,14	62,55	55,93	54,09	27,17	20,42	12,31	74,02	54,22	39,50	32,27	11,14	1,69
Н	III			3,99	7,93	16,30	41,13	48,69		6,15	10,43	14,18	22,27	46,90
К	II	21,76	37,45	40,08	37,98	56,53	38,45	39,00	25,98	39,62	50,07	53,55	66,59	51,42

Таблица 2

**Количественная оценка продуктов реакции  
ДНК рBR 322 с белками фракции 0,15**

Донор								Больной						
Дор-ки	К	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
Время мин		0	2,5	5	10	20	60	0	2,5	5	10	20	60	
Форма	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	
Д	I	80,14	65,63	22,35	12,48	4,64	3,13	2,05	62,16	34,96	12,73	11,17	5,01	1,69
Н	III			5,08	7,84	9,82	15,19	27,56		5,37	28,49	32,38	35,88	58,64
К	II	19,86	34,37	72,57	79,68	85,55	81,68	70,40	37,84	59,67	58,78	56,45	59,11	39,67

Таблица 3

## Количественная оценка продуктов реакции

## ДНК рВР 322 с белками фракции 0,4

Донор								Больной					
Дорожки	К	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Время, мин		0	2,5	5	10	20	60	0	2,5	5	10	20	60
Форма	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
Д Н К	I	77,02	63,53					63,15	0,51				
	III												38,92
	II	21,08	36,47	100	100	100	100	36,85	99,49	100	100	100	61,08

Как выяснили, активности ДНКаз хроматина отдельных больных существенно различались (рис5). В частности, у двух из 9 больных ДНКазная активность значительно (в 3-4 раза) превышала активность ДНКазы здорового донора (рис. 5,А), в четырех случаях активность ДНКазы больных превышала активность ДНКаз клеток здоровых доноров на 30-50 %, а в трех случаях активность ДНКазы здоровых доноров была выше, чем активность ДНКазы больных (рис. 5,Б), то есть установлена положительная корреляция между активностью  $Mn^{2+}$ -зависимой ДНКазы и стадией развития болезни.

Таким образом, в клетках лимфоцитов больных выявлены две активности:  $Ca^{2+}, Mg^{2+}$ -зависимая и  $Mn^{2+}$ -зависимая ДНКазные активности. Причем в клетках больных выше  $Mn^{2+}$ -зависимая ДНКазная активность а, в клетках здоровых доноров -  $Ca^{2+}, Mg^{2+}$ -зависимая ДНКазная активность. Особенно выражены эти отличия во фракции белков 0,15 - белков лабильно связанных с хроматином.

По литературным данным, в апоптотирующих клетках периферической крови определяются, как правило, эндонуклеазы активируемые ионами  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$ . Например, показано, что ядра тимоцитов содержат значительные количества  $Ca^{2+}, Mg^{2+}$ -зависимой эндонуклеазы, как полагают, этот энзим активируется глюкокортикоидом.  $Ca^{2+}, Mg^{2+}$ -зависимая эндонуклеаза найдена в Т-лимфоцитах. В-лимфоциты, единственная популяция клеток, где определяется большое количество  $Ca^{2+}, Mg^{2+}$ -зависимой эндонуклеазы. Является ли эта эндонуклеаза единственным белком (Iseki et al., 1991; King et al., 1994), синтез которого необходим? Или существует множество новых эндонуклеаз в экстрактах Т-клеток не установлено. Однако в других Т-клетках, подверженных апоптозу, например, в тимоме S49, где происходит фрагментация ДНК при инкубации с дексаметазоном, эндонуклеаза не определялась. Таким образом, вопрос индукции нуклеаз в клетках периферической крови остается спорным.

Необходимая роль кальция в апоптозе также оспаривается. Есть примеры, когда фрагментация ДНК не зависит от внеклеточного  $Ca^{2+}$  (Beaver, Waring, 1994). С другой стороны, получили признание представления о значимости кальция для обеспечения функционирования живых клеток. В интактных клетках концентрация кальция низкая и поддерживается внутри клетки практически постоянной. Полагают, что повышение концентрации кальция и сдвиг pH цитоплазмы является стимулом для активации генетического аппарата клетки (Bertidge, 1985). Сверхкритическое увеличение уровня внутриклеточного (цитозольного) кальция на фоне уменьшения величины pH является стимулом для активации биохимических механизмов, в нормальных условиях себя не проявляющих. Роль триггерного механизма, обеспечивающего вступление процесса в необратимую стадию, отдают ферменту - эндонуклеазе.



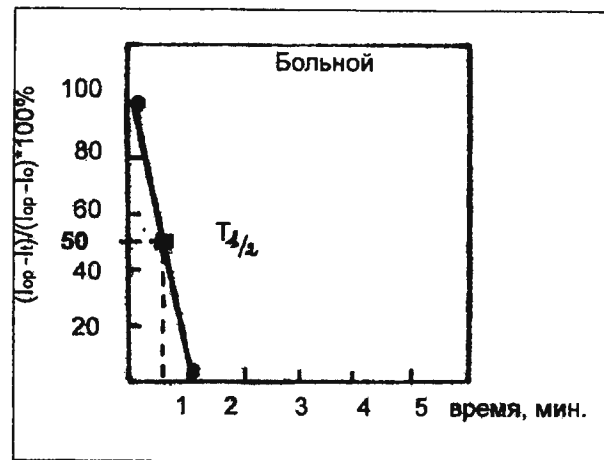
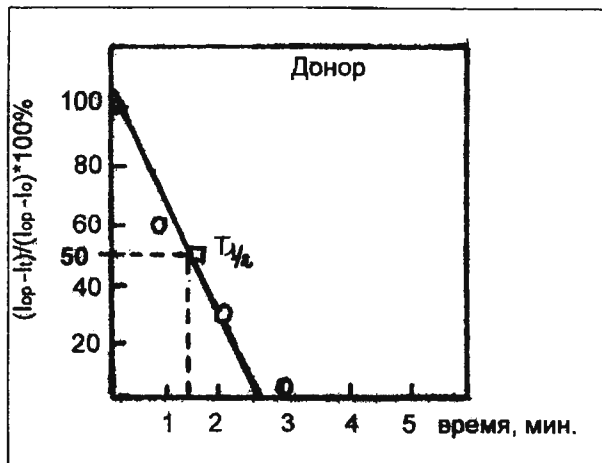


Рис.5. Кинетика гидролиза ДНК рBR 322 ДНКазой больной фракции 0,4 (масштаб полулогарифмический); где  $I_0$  - интенсивность флуоресценции комплекса ДНК - ДНКазы (момент внесения фермента -0 мин);  $I_t$  - интенсивность флуоресценции комплекса ДНК-ДНКазы через  $t$  время;  $I_{op}$  - флуоресценция в условиях, когда все молекулы ДНК открыты;  $T_{1/2}$  - время, в течение которого половина молекул суперспиральной ДНК получила разрывы;  $T_{1/2}$  для реакции ДНК с ДНКазой здорового донора равно 1,5 мин,  $T_{1/2}$  для реакции ДНК с ДНКазой больной бронхиальной астмой равно 0,5 мин.

Активация эндонуклеазы сопровождается фрагментацией ДНК. Само по себе это уже неизбежно обеспечивает гибель клетки. В частности установлено, что активация эндонуклеазы и гибель тимоцитов на раннем этапе зависит от значительно повышения в цитозоле концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , наибольшее количество, которого имело внеклеточное происхождение (Отпенус et al., 1992). В работе (Oshimi, Miyazaki, 1995) определенно утверждается, что для лимфоидных клеток характерен  $\text{Ca}$ -зависимый путь апоптоза, и увеличение кальция - это фактор провоцирующий апоптоз в тимоцитах (Beaver, Waring, 1995) и лимфоцитах (Oshimi, Miyazaki, 1995), и подтверждается это утверждение данными работы (Green, Scott, 1994), где на В-лимфоцитах человека показано, что снижение кальция тормозит апоптоз этих клеток.

Такие результаты могут зависеть от особенностей реализации апоптотического сигнала в разных клетках, от распределения  $\text{Ca}^{2+}$  по клеточным пулам, характера связи с разными соединениями, в том числе и с  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающими буферными белками клетки: кальбандином, кальсеквестрином, парвальбумином. Например, апоптоз в лимфоцитах можно заблокировать при трансфекции генома, кодирующего кальбандин, то есть, понижая содержание свободного внутриклеточного кальция путем его связывания избытком кальбандина (Dowel et al., 1992).

Осуществляется взаимосвязь кальция и рецептора опосредованно через генетический аппарат. В качестве косвенного подтверждения такого предположения, можно считать данные об изменении паттерна транскрипции перед вступлением клетки в процесс апоптотической гибели. В результате экспрессии гена/или генов программируемой клеточной гибели проявляются факторы, способные существенным образом изменить проницаемость потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, активность систем ионного обмена, а также вызвать мобилизацию внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  из депо.

Учитывая полученные нами экспериментальные данные о снижении в лимфоцитах больных  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -зависимой ДНКазной активности и литературные данные о роли свободного кальция в апоптозе лимфоцитов, позволим себе высказать предположение, что причиной устойчивости к апоптозу лимфоцитов больных бронхиальной астмой является снижение концентрации внутриклеточного кальция, из-за нарушения в генетическом аппарате. В результате снижается активность  $\text{Ca}$ ,  $\text{Mg}$  - зависимой ДНКазы и запускается механизм активации  $\text{Mn}^{2+}$ -зависимой эндонуклеазной активности.

## ВЫВОДЫ

1. Из лимфоцитов периферической крови человека выделены две нуклеазы:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -зависимая и нейтральная  $\text{Mn}^{2+}$ -зависимая ДНКазы белков хроматина. Показано, что  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -зависимая ДНКаз находится во фракции

белков лабильно связанных с хроматином,  $Mn^{2+}$ -зависимая ДНКазы обнаруживается во фракции белков прочно связанных с хроматином.

2. Установлена положительная корреляция активности нейтральной  $Mn^{2+}$ -зависимой ДНКазы и тяжестью течения бронхиальной астмы. Ремиссия заболевания у больных сопровождается снижением активности нейтральной  $Mn^{2+}$ -зависимой ДНКазы белков хроматина лимфоцитов.

3. Показано, что определение активности нейтральной  $Mn^{2+}$ -зависимой ДНКазы у больных бронхиальной астмой может иметь диагностическое и прогностическое значение, при оценке эффективности проводимого лечения.

4. Разработан метод выделения фракции белков хроматина лимфоцитов и определения активности  $Mn^{2+}$ -зависимой ДНКазы из небольшого количества крови человека, который может быть использован при диагностике астмы.

5. Проведено сравнительное изучение  $Ca^{2+}, Mg^{2+}$ -зависимой ДНКазы лимфоцитов больных бронхиальной астмой и здоровых доноров. Показано что лимфоциты больных бронхиальной астмой имеют более низкую активность  $Ca^{2+}, Mg^{2+}$ -зависимой ДНКазы. Снижение активности нуклеазы коррелирует с устойчивостью лимфоцитов больных бронхиальной астмой к апоптозу.

#### Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Бойчук С.В., Мустафин И.Г., Мбайнаджи Л. Механизмы устойчивости лимфоцитов больных атопией к процессу спонтанного апоптоза // VII Всероссийская школа молодых ученых "Актуальные проблемы нейробиологии", 27-29 сент. - Казань, 2000. - С.31-32. (Тез.)

2. Мбайнаджи Л. Исследование ДНКазной активности лимфоцитов крови человека при аллергических заболеваниях // I Научная конференция молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета, 20-21 октября. - Казань, 2000. - С.60-61. (Тез.)

3. Мбайнаджи Л., Винтер В.Г., Абрамова З.И. Исследование ДНКазной активности лимфоцитов крови человека при бронхиальной астме // Каз. ун-т. - Казань, 2001. - 22с. - Деп. в ВИНТИ 18.01.01, № 138 - В01.

4. Мбайнаджи Л., Винтер В.Г., С.В. Бойчук, Абрамова З.И. Механизмы устойчивости клеток периферической крови больных атопическими заболеваниями к спонтанному апоптозу // В сб.: XII Всероссийской юбилейной конференции "Ферменты микроорганизмов", 5-8 февраля. - Казань, 2001. - С.65-66 (Тез.).

5. Бойчук, И.Г. Мустафин., Р.С. Фассахов., Мбайнаджи.Л. Апоптоз лимфоцитов при атопической бронхиальной астме // Пульмонология. - 2001. - № 1 (в печати).

Подписано в печать 18.05.2001 г.  
Усл. печ. л. 1,19. Тираж 100 экз.  
Отпечатано с готового оригинал-макета  
в издательском комплексе  
Управления международных связей КГУ